

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESEN (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/074546 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00605
- (22) Internationales Anmeldedatum:
20. Februar 2003 (20.02.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 08 877.2 1. März 2002 (01.03.2002) DE
102 48 318.3 16. Oktober 2002 (16.10.2002) DE
- (71) Anmelder: ERDMANN, Volker, A. [DE/DE]; Argentinische Allee 2, 14163 Berlin (DE).
- (71) Anmelder und
- (72) Erfinder: LAMLA, Thorsten [DE/DE]; Thielallee 63, 14195 Berlin (DE).
- (74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Gelfertstr. 56, 14195 Berlin (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/074546 A2

(54) Title: STREPTAVIDIN-BINDING PEPTIDE

(54) Bezeichnung: STREPTAVIDIN-BINDUNGSPEPTID

(57) Abstract: The invention relates to novel streptavidin-binding peptides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt neue Streptavidin-Bindungspeptide.

Streptavidin-Bindungspeptid

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Streptavidin-Bindungspeptid,
5 sowie Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bin-
dungspeptides in einem zellbasierten oder zellfreien
Proteinbiosynthesystem.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Verwendung eines
10 Streptavidin-Bindungspeptides zur Aufreinigung eines in
einem Proteinbiosynthesystem hergestellten definierten
Proteins, sowie die Verwendung eines Streptavidin-Bin-
dungspeptides zur Markierung eines definierten Proteins.

15 Stand der Technik

Verfahren zur effizienten Expression von definierten Pro-
teinen in verschiedensten pro- und eukaryontischen Orga-
nismen sind bekannt und bedürfen keiner weiteren Erläute-
20 rung. Unter definierten Proteinen werden in diesem Zusam-
menhang Peptide und/oder Proteine verstanden, die in dem
zur Expression verwendeten Organismus oder zellfreien Ex-
pressionssystem natürlicherweise oder nach Transformation
bzw. Einsatz definierter RNA exprimiert und in Aufreini-
25 gungsschritten angereichert werden.

Verfahren zur zellfreien Expression von definierten Pro-
teinen sind beispielsweise aus den Literaturstellen EP
0312 617 B1, EP 0401 369 B1 und EP 0 593 757 B1 bekannt.
30 Demgemäß werden die für eine Transkription und/oder Trans-
lation notwendigen Komponenten neben einem für ein defi-
niertes Protein kodierenden Nukleinsäurestrang in einem
Reaktionsgefäß inkubiert und nach der Expression die

Polypeptide/Proteine aus der Reaktionslösung isoliert. Sowohl die für die Transkription, als auch die für die Translation notwendigen Komponenten lassen sich aus den Überständen pro- oder eukaryontischen Zelllysaten nach 5 einer Zentrifugation gewinnen.

Ein wesentliches Problem bei der Expression von definierten Proteinen in pro- und eukaryontischen Organismen und bei der zellfreien Expression liegt in der Aufreinigung 10 und/oder der Detektion der exprimierten definierten Proteine. Dies ist insbesondere bei definierten Proteinen problematisch, für die es keine Antiseren oder monoklonale Antikörper gibt. Zur Vereinfachung der Aufreinigung und der Detektion solcher definierten Proteine werden diese 15 als sogenannte Fusionsproteine exprimiert. Hierbei wird dem definierten Protein N- und/oder C-terminal eine Aminosäuresequenz angefügt oder zwischen zwei Proteindomänen (intern) eingefügt, der Fusionspartner. Dies geschieht auf der Nukleinsäureebene, so daß sowohl das definierte Protein 20 in, als auch der zur Detektion und/oder Reinigung angefügte Fusionspartner während eines Transkriptions-/Translationsvorganges zusammen als ein chimäres (Fusions-) Protein exprimiert werden, bestehend aus dem definierten Protein und dem Fusionspartner. Hierbei kann es sich bei dem ange- 25 fügten Fusionspartner um einzelne Aminosäuren, aber auch um Peptide oder Proteine handeln. Für diese angefügten Fusionspartner stehen zur Aufreinigung immobilisierte Bindungspartner zur Verfügung, mit denen die Fusionsproteine isoliert werden können. Neben der Möglichkeit der Reinigung 30 der Proteine können diese auch mit für den Fusionspartner spezifischen Bindungspartner nachgewiesen werden. Diese Bindungspartner können für den Fusionspartner spezifische Antikörper oder auch andere Proteine, Peptide oder

chemische Verbindungen sein, die an den Fusionspartner spezifisch binden.

Beispiele für solche Fusionspartner sind der Myc-tag (Munro & Pelham (1986) Cell 46, 291-300; Ward et al. (1998) Nature 341, 544-546), das Flag Peptid (Hopp et al. (1988) Bio/Technology 6 1204-1210), das KT3 Epitop Peptid (Martinet et al. (1990) Cell 63, 843-849; Martin et al. (1992) Science 255, 192-194) und das alpha-tubulin Epitop Peptid (Skinner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 14163-14166), die alle erfolgreich für die Detektion und teilweise auch für die Reinigung von Proteinen genutzt wurden. Es konnte für einen Teil der Fusionspartner, die normalerweise 3 bis 12 Aminosäuren lang sind, gezeigt werden, daß sie nicht die biologische Funktion der definierten Proteine beeinflussen. Die biologische Funktion des definierten Proteins wird dagegen mit zunehmender Länge des Fusionspartners beeinflusst, da die zusätzlich exprimierten Aminosäuren z. B. die Ausbildung der Sekundär-, Tertiär und/oder Quartärstruktur beeinflussen können. Längere Fusionspartner sind daher zur Detektion der Proteine, aber weniger zur Reinigung der Proteine geeignet. Auf der anderen Seite weisen längere Fusionspartner oft eine höhere Affinität mit ihren spezifischen Bindungspartnern auf.

Ein wesentlicher Nachteil der oben genannten Fusionspartner bei der Aufreinigung ist darin begründet, daß die Bindung an den Bindungspartner auf einer Antigen/Antikörperbindung beruht und die Herstellung und Reinigung der als Bindungspartner genutzten Antikörper aufwendig und teuer ist. Ein weiterer Nachteil liegt darin begründet, daß die Antigen/Antikörperbindung eine sehr starke Bindung

zwischen dem Bindungspartner, z. B. an eine Matrix immobilisierten Antikörper, und dem Fusionspartner bedingt. Diese hat zur Folge, daß bei der Elution der über den Fusionspartner gebundenen Fusionsproteine, teilweise extrem unphysiologische Bedingungen bezogen auf das definierte Protein geschaffen werden müssen. Unter unphysiologischen Bedingungen sind in diesem Zusammenhang Bedingungen zu verstehen mit z. B. sehr hohe oder äußerst geringe Salzkonzentrationen, Einsatz von chaotropen Salzen und pH-Werte, die weit von dem natürlichen pH-Wert des definierten Proteins abweichen. Diese kann u. U. die Struktur und/oder Funktionalität des definierten Proteins beeinflussen oder irreversibel zerstören. Dementsprechend sollte die Reinigung der definierten Proteine unter möglichst schonenden, physiologischen Bedingungen geschehen, um die Funktionalität der Proteine zu erhalten. Zwar konnte bei drei der oben genannten Fusionspartnern (Hopp et al. (1988) (Martin et al. (1990) (Skinner et al. (1991)) eine Elution auch unter schonenden Bedingungen mittels kompetitiver Peptide erzielt werden, doch bleibt das Problem der aufwendig und teuer herzustellenden und zu reinigenden (als Bindungspartner dienenden) Antikörper und deren Bindung an die Matrix.

Weitere Fusionspartner, bestehend aus 8 bis 9 Aminosäuren, sind aus den Literaturstellen US 5,506,121 und Schmidt & Skerra (Protein Engineering, vol. 6, no. 1, 109-122, 1993) bekannt. Die dort offenbarten Fusionspartner sind in der Lage an das Streptavidin oder an das "core" Streptavidin, ein proteolytisch gespaltenes Produkt des Streptavidin, zu binden (Bayer et al. (1989) Biochem. J. 259,369-376).

Alle bekannten Fusionspartner, die an das Streptavidin binden enthalten die Aminosäureabfolge HPQ, das sog. HPQ-Bindungsmotiv, welches mit der Biotin-Bindungstasche des Streptavidin in Wechselwirkung tritt. Zu den Bereits be-
5 kannten Peptiden gehören dem sog. Strep-tag I: AWRHPQFGG mit einer Dissoziationskonstanten K_d von 10-37 μM , der sog. Strep-tag II: WSHPQFEK mit einer Dissoziationskonstanten K_d von 18-72 μM und der sog. SBP-tag:
MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGGQREP mit einer Dissozia-
10 tionskonstanten K_d von 2,5 nM. Im Gegensatz zu den beiden kurzen Strep-tags I und II besitzt der längere SBP-tag eine wesentlich stärkere Bindung zum Streptavidin. Allerdings wird, wie oben ausgeführt, die Funktion des definierten Proteins insbesondere mit zunehmender Länge des
15 Fusionspartners beeinflusst. Auch stören besonders lange Fusionspartner bei der Kristallisation der definierten Proteine.

20 Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein möglichst kurzes Streptavidin-Bindungspeptid mit einer
25 starken Bindung zum Streptavidin zur Verfügung zu stellen.

Grundzüge der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen.

30

Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine oder bestehend aus einer Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12.

Mit dem erfindungsgemäßen Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12 wird, verglichen mit dem Stand der Technik, eine wesentlich
5 stärkere Bindung zwischen dem Streptavidin-Bindungspeptid und dem Streptavidin erreicht, bzw. kann bei gleicher Bindungsstärke das Streptavidin-Bindungspeptid wesentlich verkürzt werden.

10 Des Weiteren lehrt die Erfindung ein Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12, sowie ein Plasmid enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Es versteht sich, daß die Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Streptavidin-Bindungs-
15 peptid und/oder das Plasmid dem jeweiligen Expressionssystem/Proteinbiosynthesesystem angepaßt werden kann. Das Plasmid kann als ein Expressionsvektor, insbesondere für Bakterien, ausgelegt sein enthaltend einen Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym,
20 in dem die Nukleinsäuresequenz codierend für ein definiertes Protein inseriert werden kann und somit das definierte Protein zusammen mit dem Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 exprimiert wird. Es versteht sich, daß der für das definierte Protein und für das Streptavidin-
25 Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 codierende Bereich sich unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters und/oder Operators und Terminators befinden. Der Bereich mit mindestens einer Schnittstelle für mindestens ein Restriktionsenzym kann sowohl in 5', als auch in 3' Richtung vom
30 Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 liegen. Der Nukleinsäurebereich codierend für das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 muß nicht unmittelbar an den

Nukleinsäurebereich codierend für das definierte Protein anschließen, vielmehr können zwischen den beiden Bereich noch Nukleinsäuren liegen, die für 1 bis 20 Aminosäuren, insbesondere für 5 bis 10 Aminosäuren, codieren.

5

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12, wobei eine Nukleinsäure in einem zellbasierten oder zellfreien Proteinbiosynthesystem exprimiert oder überexpri-
10 miert wird. Dieses so hergestellte Peptid läßt sich leicht über die Bindung an Streptavidin isolieren. Das erhaltene Translationsprodukt, i. e. ein Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12, wird mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden. Nach Abtrennung der
15 Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen wird das Translationsprodukt eluiert. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das erhaltene
20 Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12 trägt im Falle der Fusion mit dem definierten Protein dieses Protein. Es kann der auch unabhängig von einem definierten Protein zur Antikörperherstellung genutzt werden. Die erhaltenen Antikörper können z. B. zur Detektion oder zur Auf-
25 reinigung der Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12, bzw. im Fall, daß das Streptavidin-Bindungspeptide gemäß Seq.-ID 1 - 12 als Fusionspartner eingesetzt wird, des an diesen Fusionspartner gebundenen definierten Proteins genutzt werden.

30

Es versteht sich, daß die Herstellung eines solchen Streptavidin-Bindungspeptides enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12 z. B. auch mittels chemischer

Festphasensynthese, beispielsweise mit einem Syntheseautomat der Firma Abimed (Langenfeld, BRD) möglich ist. Diese Methode basiert auf den Standardprotokollen der Fmoc-Chemie (Fmoc=9-fluorenylmethoxycarbonyl).

5

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbiosynthesystem hergestellten definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein in und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das so erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem Streptavidin kontaktiert und daran gebunden wird und wobei nach Abtrennung der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen Substanzen das Translationsprodukt eluiert wird. Die Elution kann unter schonenden Bedingungen für das definierte Protein erfolgen. Als Elutionsmittel können Puffer verwendet werden, die Biotin oder verwandte Substanzen und/oder Derivate, wie Iminobiotin, Desthiobiotin und/oder Diaminobiotin, enthalten. Das hergestellte definierte Protein kann das als Fusionspartner dienende Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 12 sowohl N- und/oder C-terminal enthalten.

25

Bei Verwendung einer Streptavidin-Sepharose-Säule kann das zu untersuchende definierte Protein mittels des als Fusionspartner dienenden Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 an der Matrix immobilisiert und aus einem Gemisch von Molekülen, z.B. einem Zelllysate, isoliert werden.

30

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 zur Markierung eines definierten Proteins, wobei eine für das definierte Protein und, hiermit verbunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translationsprodukt mit einem Streptavidin-Konjugat enthaltend ein Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird. Das markierte definierte Protein kann das zur Markierung dienende Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 N- und/oder C-terminal enthalten. Reportermoleküle können z. B. radioaktive und/oder radioaktiv markierte Substanzen sein. Es versteht sich, daß das Streptavidin als solches auch radioaktiv markiert und/oder radioaktiv sein kann; in diesem Fall kann auf ein Reportermolekül verzichtet werden. Reportermoleküle können auch fluoreszierende Substanzen oder Enzyme, wie z. B. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, sein. Durch solche mit einem Reportermolekül gekoppelte Streptavidinverbindungen lassen sich beispielsweise Proteine, die das Streptavidin-Bindungspeptides gemäß Seq.-ID 1 - 12 als Fusionspartner besitzen, auf einem Western-Blot oder im ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) nachweisen und/oder quantifizieren. Handelt es sich bei den definierten Proteinen um Bindungsproteine, können auf diese Weise auch an diese bindende andere Proteine nachgewiesen werden. Unter Bindungsproteine sind in diesem Zusammenhang Proteine zu verstehen, die selbst andere Proteine binden und/oder selber an andere Proteine binden, wie z. B. bei einer Antigen/Antikörperbindung oder bei einer Bindung eines Proteins an einen Rezeptor.

Bevorzugt ist ein Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend weniger als 30 Aminosäuren, vorzugsweise weniger als 20 Aminosäuren, höchstvorzugsweise weniger als 10 Aminosäuren.

5

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Figuren sowie Beispielen näher erläutert.

10 Fig. 1: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine Streptavidin-Affinitätssäule. Es wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. (A) Coomassie gefärbt
15 und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Reaktionsmischung; (3) Durchlauf der Probenauftragung; (4-6) Waschfraktionen; (7-9) Elutionsfraktionen; (10) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.
20

Fig. 2: Reinigung von FABP mit Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Motiv 3 als Fusionspartner nach zellfreier Proteinbiosynthese über eine StrepTactin-Affinitätssäule. Es wurden von jeder Fraktion eine vergleichbare Menge mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. (A) Coomassie gefärbt
25 und (B) Autoradiogramm. Die Proben in den nummerierten Spuren sind (1) Molekulargewichtsmarker; (2) Durchlauf der Probenauftragung; (3-5) Waschfraktionen; (6-10) Elutionsfraktionen; (11) radioaktiver Molekulargewichtsmarker.
30

Beispiel 1 : erfindungsgemäße Bindungspeptide und Vergleichs-peptide mit Dissoziationskonstanten

5

In fachüblicher Weise wurde das FAB Protein (fatty acid binding protein) aus Rinderherzen *in vitro* in einem zellfreien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystemes exprimiert. Das exprimierte
10 FAB Protein besaß am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes zusätzliches Streptavidin Bindungspeptid mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen als Fusionspartner.

15 Zwei Bindungspeptide enthalten in ihrer Aminosäuresequenz das im Stand der Technik beschriebene HPQ-Motiv (Motiv 1 und 2) und zwei enthalten das erfindungsgemäße Streptavidin-Bindungspeptid gemäß Seq.-ID 1 - 6 (Motiv 3 und 4). Die Sequenzen der Peptide sind in der Tabelle 1 dargestellt.
20 stellt. Zusätzlich wurden die exprimierten Proteine mit einem am C-terminus befindlichen "His-tag", bestehend aus 6 Histidinen, versehen. Die Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie über Ni^{2+} -IDA-Agarose in fachüblicher Weise aufgereinigt. Man erkennt, dass bei gleicher Länge
25 Bindungspeptide mit einer erfindungsgemäßen Sequenz eine wesentlich niedrigere Dissoziationskonstante als ein Bindungspeptid mit HPQ-Motiv aufweist. Der K_d -Wert eines erfindungsgemäßen Bindungspeptids liegt in der Größenordnung des SBP-Tags trotz des ca. 2,5-fachen Länge des SBP-Tags.

30

Tabelle 1

	Sequenz	Dissoziations- konstante [kd]
5 Motiv 1	D L Y D I D R N W V G H P Q G	8 μ M
Motiv 2	D N Y D A D L A W D T H P Q D	70 μ M
Motiv 3	D V E A W L D E R V P L V E T	84 nM
Motiv 4	D V E A W I A D P A V H F T T	200 nM

10

Beispiel 2: Messungsweise der Dissoziationskonstanten aus
Tabelle 1.

Die Messungen der Dissoziationskonstante wurden mit einem
15 BiacoreX-System und dem Sensor Chip NTA der Firma Biacore
durchgeführt. Vermessen wurden die aus der im Beispiel 1
beschriebenen Expression hervorgegangenen Proteine, d.h.
FAB Proteine, die am N-Terminus jeweils ein aus fünfzehn
Aminosäuren bestehendes Peptid als Fusionspartner und am
20 C-Terminus 6 Histidine besaßen, die zur Immobilisierung
auf dem Sensor Chip benötigt wurden. Die Bindungsaffinität
der aus der im Beispiel 1 beschriebenen Expression hervor-
gegangenen Proteine zu Streptavidin wurde nach Herstel-
lerangaben im Biacore-Gerät vermessen. Dabei befindet sich
25 das zu vermessende Protein auf dem Sensor-Chip und eine
Streptavidinlösung mit definierter Konzentration wird ein-
gespritzt. Die Wechselwirkung (Bindung) zwischen den bei-
den Molekülen wird vom Gerät gemessen und als sog. Reso-
nanz Units (RU) angegeben. Zur Messung wurden die vom Her-
30 steller angegebenen Puffer verwendet.

Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 2 darge-
stellt. Die erhaltenen Meßwerte wurden mit der zugehörigen

Software ausgewertet und führten zu den in der Tabelle 1 angegebenen Dissoziationskonstanten.

Tabelle 2:

5

Motiv	1	2	3	4
Streptavidinkonz.	RU	RU	RU	RU
15 nM			98	
30 nM			242	68
10 60 nM			461	171
125 nM			613	280
250 nM			704	384
500 nM	62		786	478
15 1 µM	123		-	560
2 µM	233		946	644
3 µM	-	64	-	
4 µM	407	-	983	
20 6 µM	-	98		
8 µM	621	-		
15 µM	-	201		
16 µM	779	-		
25 30 µM	-	337		
32 µM	955	-		
60 µM		536		

30 Beispiel 3: Aufreinigung eines Fusionsproteins

In fachüblicher weise wurde das FAB Protein, das am N-terminus ein aus fünfzehn Aminosäuren bestehendes

- zusätzliches Peptide mit der Aminosäuresequenz D V E A W L D E R V P L V E T (Motiv 3) als Fusionspartner besaß, *in vitro* in einem zellfreien Proteinbiosynthese mittels eines gekoppelten Transkriptions-Translationssystems exprimiert.
- 5 Zur Aufreinigung des überexprimierten definierten Proteins wurde das Streptavidin an einer Festphase gekoppelt. Als Festphase diente eine Sepharose. Das exprimierte FAB Protein wurde anschließend in fachüblicher Weise affinitätschromatographisch über eine Säule enthaltend Streptavidin-Sepharose oder StrepTactin-Sepharose aufgereinigt.
- 10 Für die Aufreinigung wurden folgende Puffer verwendet: Waschpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA).
- 15 Für die Elution von Streptavidin enthielt der Waschpuffer 2 mM Biotin und für die Elution von StrepTactin enthielt der Waschpuffer 2,5 mM Desthiobiotin.

Die prozentuale Verteilung des eingesetzten definierten Proteins auf die verschiedenen Fraktionen der Affinitätschromatographie ist in der Tabelle 3 zu entnehmen. In der Tabelle 3 steht D für den Auftragung der Probe/Durchlauf, W für die Waschfraktion und E für die Elutionsfraktion.

25 Tabelle 3

Fraktion	D	W1	W2	W3	E1	E2	E3	E4	E5	Summe
Strept- avidin	3,5%	6,8%	1,0%	0,3%	0,4%	76,9%	0,7%	-	-	89,6%
30 StrepT- actin	3,0%	7,4%	1,8%	0,9%	0,9%	45,9%	23,2%	1,0%	0,3%	84,4%

Bei der Verwendung von Streptavidin-Sepharose konnten 90% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen

werden, wobei 78% auf das Eluat entfielen. Die Qualität der Aufreinigung ist in Fig. 1 dargestellt.

Bei der Verwendung von StrepTactin-Sepharose konnten 84%
5 des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden, wobei 71% auf das Eluat entfielen. Die Qualität der Aufreinigung ist in Fig. 2 dargestellt.

10 Beispiel 4: Optimierung einzelner Bindungspeptide

Das Bindungspeptid (FAx 3) mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET wurde einer Substitutionsanalyse unterzogen, wodurch ein etwaiges Minimalmotiv (=verkürztes Peptid) identifiziert
15 und die Wirkung einzelner Aminosäureaustausche auf die Bindungsspezifität untersucht werden sollten. Bei einer Substitutionsanalyse werden Peptide mittels Spot-Verfahren (Frank, R. 1992) auf einer als Festphase dienenden Cellulosemembran synthetisiert. Dabei wurde jede Position des
20 15 Aminosäuren umfassenden Peptids systematisch durch die übrigen 19 L-Aminosäuren ersetzt.

Die Substitutionsanalyse wurde mit einem Peroxidase-markierten Streptavidin inkubiert und mit einem Lumineszenz-
25 substart entwickelt. Dadurch konnte festgestellt werden wie weit sich das Peptid verkürzen läßt und welche Aminosäuren "konserviert" und somit nicht oder nur sehr schlecht austauschbar sind. Es ergab sich folgendes Bild: Ein Peptid, das hinreichende Streptavidinbindung aufweist
30 ist das 6-mer Peptid DVEAWL. Eine deutliche bessere Streptavidinbindung weist das 9-mer Peptid DVEAWLDER auf. Die Substitutionsanalyse wies auch auf Positionen hin, wo der Austausch der ursprünglichen gegen eine andere Aminosäure

eine Verbesserung der Streptavidinbindung mit sich bringen könnte.

Die Informationen aus der Substitutionsanalyse wurden
5 überprüft, indem die Bindungskonstanten verschiedener Peptide mittels "Oberflächen Plasmonen Resonanz" Spektroskopie unter Verwendung eines BIAcore-Gerätes bestimmt wurden. Die Messungen erfolgten mit dem NTA Sensor-Chip der Firma BIAcore und mit Hilfe des fettsäurebindenden Proteins aus dem Rinderherzen (FABP). Das FABP diente zur
10 Immobilisierung und Präsentation der Peptide. Weiterhin sollten so die bei einer Affinitätschromatographie auftretenden Bedingungen simuliert werden, da das Peptid zukünftig als Affinitätspeptid zur Aufreinigung von Proteinen
15 verwendet werden soll. Im Gegensatz zu den ersten Messungen, wo die zu vermessenden Peptide die vier N-terminalen Aminosäuren des FABP ersetzten, war die Anordnung der Peptide diesmal ebenfalls N-terminal, aber sie waren nicht Teil des FABP. Auch der für die Immobilisierung notwendige
20 His-tag wurde verändert. Er befand sich wie bei den ersten Messungen am C-Terminus des FABP, wurde aber von sechs auf acht Histidine erweitert und zudem durch einen aus zwei Glycinen bestehenden Linker vom FABP distanziert. Dadurch konnte die Immobilisierung der Liganden deutlich verbessert und somit die Drift der Basislinie, die aus dem Herunterwaschen des Liganden resultiert, minimiert werden.
Für jede Messung wurde eine identische Menge des jeweiligen FABPs immobilisiert, die einem Anstieg der Basislinie um 1100 Resonanzeinheiten (RU) entsprach. Als Referenz
30 diente das FABP mit dem His-tag, aber ohne N-terminales Bindungspeptid.

Die aus der optimierten Meßmethode hervorgehenden Bindungskonstanten waren folgende:

		Kd
5	Peptid (FAx 3): D V E A W L D E R V P L V E T (AspValGluAlaTrpLeuAspGluArgValProLeuValGluThr)	3,6 _± 0,6 nM
	verkürztes Peptid (9-mer): DVEAWLDER	240 _± 40 nM
10	Einfluß anderer Aminosäuren auf das verkürzte 9-mer Peptid:	
	3 Asp: DVDAWLDER	940 _± 140 nM
	3 Gly: DVGAWLDER	570 _± 90 nM
15	6 Phe: DVEAWFDER	nicht meßbar
	6 Arg: DVEAWRDER	nicht meßbar
	7 Gly: DVEAWLGER	17 _± 4 nM
	8 Ala: DVEAWLDAR	160 _± 30 nM
20	Positiven Einfluß zeigen insbesondere Glycin an Position 7 und Alanin an Position 8. Kombination dieser beiden Aminosäuren:	
	verkürztes Peptid: DVEAWLGAR	17 _± 4 nM
25	original Peptid mit Gly7: DVEAWLGERVPLVET	4,2 _± 0,7 nM
	original Peptid: DVEAWLGARVPLVET	4,1 _± 0,6 nM

Das original 15-mer Peptid läßt sich nicht weiter verbessern. Das verkürzten 9-mer Peptid hingegen läßt sich durch ein Glycin anstelle der Asparaginsäure an Position sieben deutlich verbessern. Auch das Alanin anstelle der Glutaminsäure an Position acht weist eine etwas bessere Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin auf. Durch die

Kombination dieser beiden Aminosäuren läßt sich zwar die Bindungsaffinität nicht weiter verbessern, aber sie verschlechtert sich auch nicht.

- 5 Die Erfindung umfasst somit auch ein 9-mer Peptid mit seinen nicht bzw. nur wenig konservierten Positionen:

DVXAWLXXR (X= beliebige Aminosäure)

- 10 Zudem natürlich das verkürzte Peptid mit Glycin an Position sieben:

DVEAWLGER

- und das verkürzte Peptid mit Glycin an Position sieben und
15 Alanin an Position acht:

DVEAWLGAR

Beispiel 5: Varianten erfindungsgemäßer Sequenzen.

20

Folgend werden erfindungsgemäß besonders geeignete Sequenzen angegeben.

- Seq.-ID 1: DVEAW
25 Seq.-ID 2: DVEA
Seq.-ID 3: VEA
Seq.-ID 4: DVE
Seq.-ID 5: VEA
Seq.-ID 6: EAW
30 Seq.-ID 7: DVXAW
Seq.-ID 8: DVXAWL
Seq.-ID 9: DVXAWLX
Seq.-ID 10: DVXAWLXX

Seq.-ID 11: DVXAWLXXR

Seq.-ID 12: DVXAWLXXRVPLVET

Seq.-ID 13: VPLVET

5 X an Position 3 kann beliebig, jedoch insbesondere E, D
oder G sein. X kann an Position 7 beliebig, jedoch insbe-
sondere G oder D sein. X kann an Position 8 beliebig, je-
doch insbesondere A oder E sein. Sequenz 13 stellt eine
optionale carboxyterminale Verlängerung der Sequenz 11
10 dar, wobei aus Sequenz 13, aminoterminal beginnend 1 bis 6
Aminosäuren an Sequenz 11 angeschlossen sein können.

15

20

25

30



Patentansprüche:

1. Streptavidin-Bindungspeptid enthaltend eine oder beste-
5 hend aus einer Aminosäuresequenz gemäß Seq.-ID 1 - 12.
2. Nukleinsäure codierend für ein Streptavidin-Bindungs-
peptid nach Anspruch 1.
10
3. Plasmid enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 2.
- 15 4. Verfahren zur Herstellung eines Streptavidin-Bindungs-
peptides nach Anspruch 1, wobei eine Nukleinsäure nach
Anspruch 2 in einem zellbasierten oder zellfreien Pro-
teinbiosynthesystem exprimiert oder überexprimiert
wird.
20
5. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach
Anspruch 1 zur Aufreinigung eines in einem Proteinbio-
synthesystem hergestellten definierten Proteins, wo-
25 bei eine für das definierte Protein und, hiermit ver-
bunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende
Nukleinsäure, optional kontrolliert durch eine regula-
torische Sequenz, einer Transkription und/oder Transla-
tion unterworfen wird, wobei eine Lösung enthaltend das
30 so erhaltene Translationsprodukt mit immobilisiertem
Streptavidin kontaktiert wird und wobei nach Abtrennung
der Lösung mit nicht an Streptavidin gebundenen

Substanzen von dem Streptavidin das Translationsprodukt vom Streptavidin freigesetzt und eluiert wird.

- 5 6. Verwendung eines Streptavidin-Bindungspeptides nach
Anspruch 1 zur Markierung eines definierten Proteins,
wobei eine für das definierte Protein und, hiermit ver-
bunden, für das Streptavidin-Bindungspeptid codierende
Nukleinsäure einer Transkription und/oder Translation
10 unterworfen wird, wobei das so erhaltene Translations-
produkt mit einem Streptavidin-Konjugat enthaltend eine
Reportermolekül kontaktiert und daran gebunden wird.

15

20

25

30

Fig. 1

10/506480

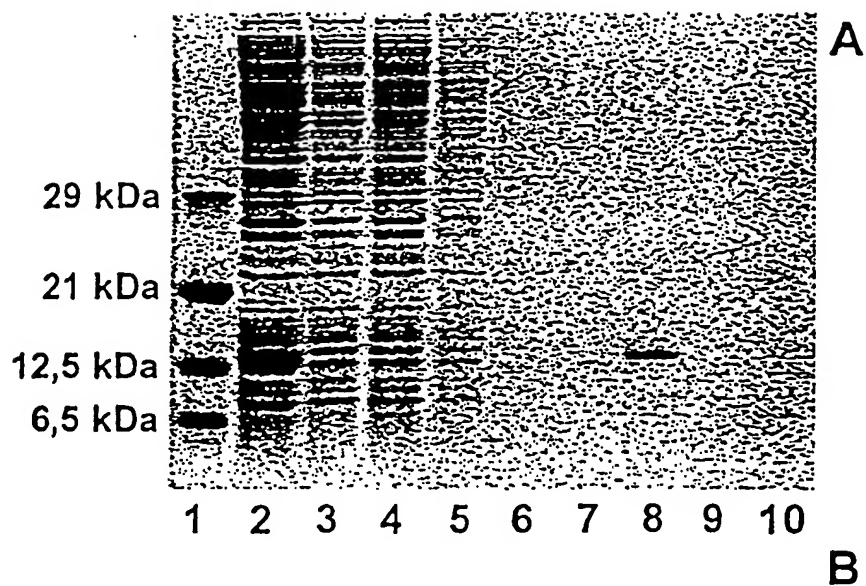
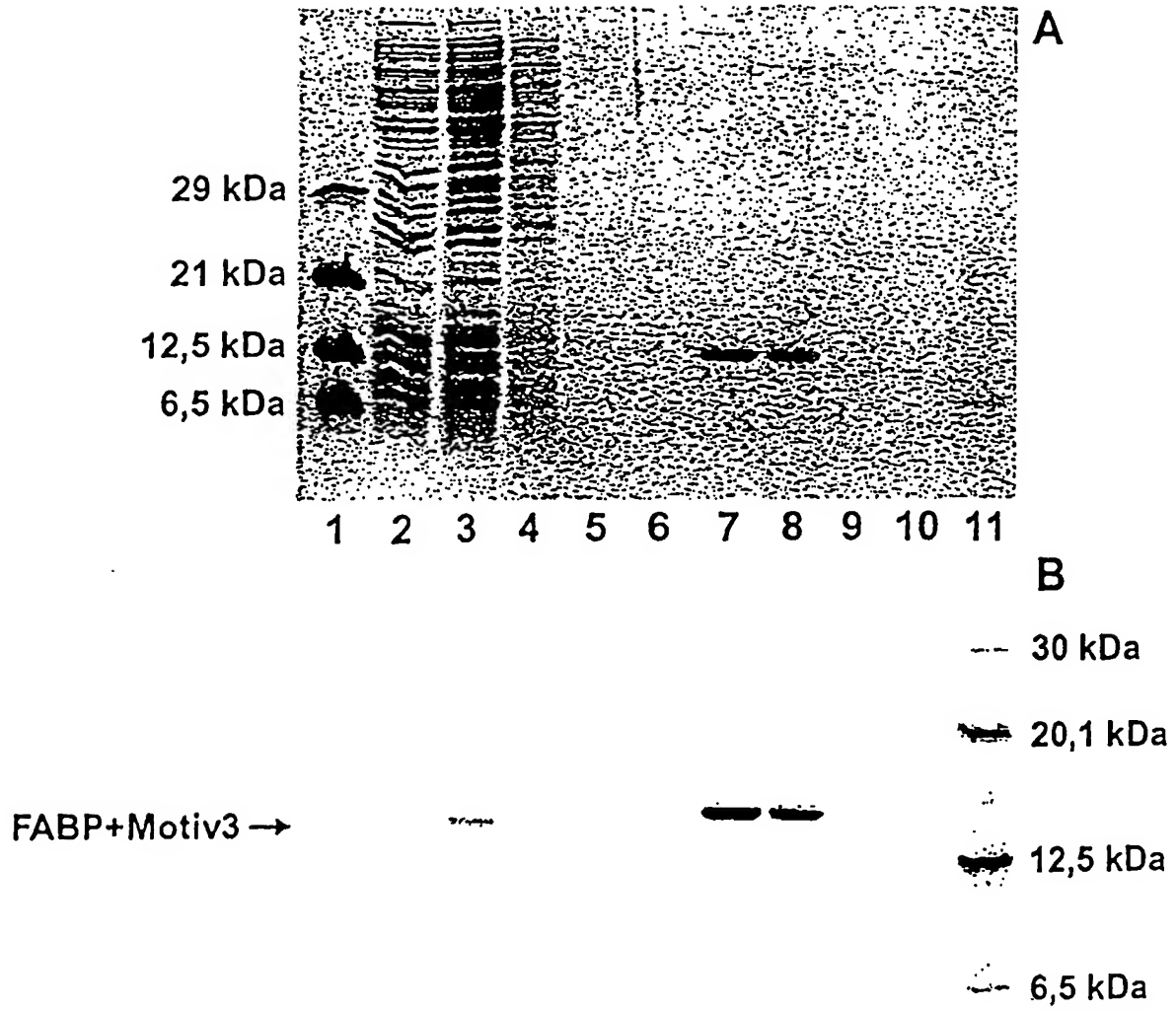


Fig. 2



10/506480

SEQUENCE LISTING

DT09 Rec'd PCT/PTO 01 SEP 2004

<110> Erdmann, Volker A.
Lamla, Thorsten

<120> Steptavidin-Bindungspeptid

<130> ERD/PCT/0303

<150> DE 10208877

<151> 2002-03-01

<150> DE 10248318

<151> 2002-10-16

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(5)

<223>

<400> 1

Asp Val Glu Ala Trp

1

5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223>

<400> 2

Asp Val Glu Ala

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (4)
<223>

<400> 3

Val Glu Ala Trp
1

<210> 4
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (3)
<223>

<400> 4

Asp Val Glu
1

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (3)
<223>

<400> 5

Val Glu Ala
1

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223>

<400> 6

Glu Ala Trp
1

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D, oder G

<400> 7

Asp Val Xaa Ala Trp
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<400> 8

Asp Val Xaa Ala Trp Leu
1 5

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<400> 9

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 10

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D, oder G

<220>
<221> misc_feature

<222> (7)..(7)
 <223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 11

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa Arg
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> beliebige Aminosäure, insbesondere E, D oder G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> beliebige Aminosäure, insbesondere D oder G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> beliebige Aminosäure, insbesondere A oder E

<400> 12

Asp Val Xaa Ala Trp Leu Xaa Xaa Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> carboxyterminal an Seq.-ID 11 anschliessende Sequenz mit 1 - 6 de
 r hier definierten Aminosäuren, beginnend aminoterminal

<400> 13

Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (15)
<223>

<400> 14

Asp Leu Tyr Asp Ile Asp Arg Asn Trp Val Gly His Pro Gln Gly
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (15)
<223>

<400> 15

Asp Asn Tyr Asp Ala Asp Leu Ala Trp Asp Thr His Pro Gln Asp
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (15)
<223>

<400> 16

Asp Val Glu Ala Trp Leu Asp Glu Arg Val Pro Leu Val Glu Thr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223>

<400> 17

Asp Val Glu Ala Trp Ile Ala Asp Pro Ala Val His Phe Thr Thr
1 5 10 15